



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Ústav zdravotnických studií



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Účinky různých typů rázových vln na
T-lymfocyty (J-JHAN)

Technická univerzita v Liberci

Ústav zdravotnických studií

Studijní program: B 3944 - Biomedicínská technika

Studijní obor: 3901R032 -Biomedicínská technika

Účinky různých typů rázových vln na T-lymfocyty (J-JHAN)

The effects of different types of shock waves on T-lymphocytes (J-JHAN)

Lucie Mikesková

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Ústav zdravotnických studií

Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Lucie Mikesková
Osobní číslo: Z10000007
Studijní program: B3944 Biomedicínská technika
Studijní obor: Biomedicínská technika
Název tématu: Účinky různých typů rázových vln na T-lymfocyty (J-JHAN)
Zadávající katedra: Ústav zdravotnických studií

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Seznámení se s problematikou rázových vln.
- 2) Vliv rázové vlny jednoduché/tandemové primárně na buňkách J-JHAN, ale připouštíme i další buňky (dle možností, co objevíme).
- 3) Způsob vyhodnocování výsledků - viabilita buněk (počet přežitých).

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: 50 - 70 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

HRAZDÍRA, I., MORNSTEIN, V. Lékařská biofyzika a přístrojová technika.

Brno : Neptun, 2001. ISBN 80-902896-1-4

ROSINA, J., KOLÁŘOVÁ, H., STANEK, J. Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů. 1. vydání, Praha : GRADA Publishing, 2006. ISBN 978-80-247-1383-0

ROZMAN, J. a kol. Elektronické přístroje v lékařství. 1. vydání, Praha : ACADEMIA, 2006. 408 s. ISBN 80-200-1308-3

TROJAN, L. a kol. Lékařská fyziologie. 4. vydání, přepracované a doplněné, Praha : GRADA Publishing, 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-5

ROSSING, Thomas D. Handbook of Acoustics. Stanford (USA) : Springer, 2007. ISBN 978-0-387-30446-5

Vedoucí bakalářské práce:

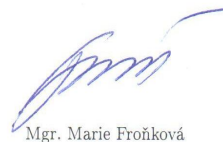
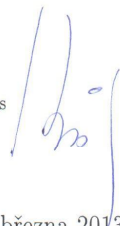
prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.

Ústav zdravotnických studií

Datum zadání bakalářské práce: 31. března 2012

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2013

prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs
rektor



Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením ústavu

V Liberci dne 29. března 2013

P r o h l á š e n í

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom(a) povinnosti informovat o této skutečnosti TUL. V tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Datum: 30. 4 . 2013

Podpis



Za odborné vedení, za cenné rady, podněty a připomínky bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce prof. MUDr. RNDr. Jiřímu Benešovi, CSc. Další dík pak patří Ing. Mgr. Lukáši Dibdiakovi za konzultace a pomoc během exponování a při správné interpretaci výsledků.

ANOTACE

AUTOR	Lucie Mikesková		
STUDIJNÍ OBOR	Biomedicínská technika		
NÁZEV PRÁCE	Účinky různých druhů rázových vln na T-lymfocyty (J-JHAN)		
VEDOUCÍ PRÁCE	prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.		
INSTITUCE	UZS	ROK ODEVZDÁNÍ	2013
POČET STRAN	48		
POČET OBRÁZKŮ	15		
POČET TABULEK	3		
POČET GRAFŮ	4		
POČET PŘÍLOH	0		
STRUČNÝ POPIS	Tato práce se zabývá problematikou jednoduché a tandemové rázové vlny. Teoretická část popisuje vlastnosti rázové vlny, druhy generátorů RV a buňky, na kterých je výzkum prováděn. Praktická část se pak věnuje účinku jak jednoduché, tak tandemové rázové vlny na T-lymfocyty. Cílem bakalářské práce je určení počtu přežitých buněk a porovnání účinnosti jednoduché a tandemové rázové vlny.		
KLÍČOVÁ SLOVA	Jednoduchá a tandemová rázová vlna, T-lymfocyty		

ANNOTATION

AUTHOR	Lucie Mikesková		
FIELD	Biomedical technology		
THESIS TITLE	The effects of different types of shock waves on T-lymphocytes (J-JHAN)		
SUPERVISOR	prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.		
INSTITUTION	UZS	YEAR	2013
NUMBER OF PAGES	48		
NUMBER OF PICTURES	15		
NUMBER OF TABLES	3		
NUMBER OF GRAPHS	4		
NUMBER OF APPENDICES	0		
SUMMARY	<p>This thesis deals with issue of single and tandem shock wave. Theoretic part of this thesis describes the shock wave's properties, the kinds of shock wave's generators and cells that are used for this research. The practical part pursues the effects of single shock wave as well as tandem shock wave on T-lymphocytes. The aim of this bachelor thesis is to determine number of cells that survived and compare the effects of single shock wave and tandem shock wave.</p>		
KEY WORDS	Single and tandem shock wave, T-lymphocytes		

OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů	9
1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.2 Neinvazivní litotrypse	11
2.1.1 Historie rázových vln	11
2.1.2 Další vývoj	12
2.1.3 Anestezie	13
2.1.4 Fyzikální princip	13
2.1.5 Fragmentace konkrementu	15
2.1.6 Porovnání rázových a ultrazvukových vln	16
2.1.7 Tandemová RV	18
2.1.8 Části litotryptoru	19
2.1.9 Technické řešení	26
2.1.10 Léčba rázovou vlnou	27
2.1.11 Interakce s živou tkání a buňkami	29
2.2 JJHAN (T- lymfocyty)	30
2.2.1 Lymfocyty	30
3. Praktická část	33
3.1 Cíl práce	33
3.2 Metodika práce	33
3.2.1 Použitý materiál	33
3.2.2 Exponování	34
3.2.3 Stanovení koncentrace živých T-lymfocytů	35
3.3 Výsledky	37
4. Diskuze	42
5. Závěry	44
Seznam literatury	45
Seznam obrázků	47
Seznam tabulek a grafů	48

Seznam použitých zkratek a symbolů

EFD	Energy flux density (hustota energie)
ESWL	Extracorporeal shock wave lithotripsy
Hz	Hertz (jednotka frekvence)
J	Joul (jednotka energie)
JRV	Jednoduchá rázová vlna
LERV	Litotrypse extrakorporální rázovou vlnou
Pa	Pascal (jednotka tlaku)
RV	Rázová vlna
TRV	Tandemová rázová vlna
TUL	Technická univerzita v Liberci
ÚFP	Ústav fyziky plazmatu
UZS	Ústav zdravotnických studií
V	Volt (jednotka napětí)

1.Úvod

Bakalářská práce se zabývá výzkumem účinků jednoduché a tandemové rázové vlny na T-lymfocytární buněčnou linii J-JHAN. Rakovina a jiné zhoubné nádory patří v dnešní době k nejobávanější onemocnění. Moderní medicína uvítá jakoukoliv novou metodu pro léčbu nádorových onemocnění. Jednou z nich by mohla být léčba pomocí rázové vlny. Nespornou výhodou rázových vln je , že dokáže lehce a bez poškození procházet měkkými tkáněmi a dají se fokusovat.

Rázové vlny se k léčbě pacienta začalo využívat od roku 1980. V současné době je rázová vlna hojně používanou metodou k fragmentaci močových kamenů (LERV) a k léčbě bolestivých stavů pohybového aparátu.

Ted' je snaha využít rázové vlny při léčbě zhoubných nádorů. Je to prozatím ve stádiu výzkumu a účinky rázové vlny na T-lymfocyty se zjišťují v rámci tohoto výzkumu. Rázová vlna je schopna rozmělnit močový konkrement, protože ten má jinou impedanci než okolnítkáň. Nádorové buňky či solidní nádor mají podobnou impedanci jako okolní měkká nevzdušná tkáň. Proto byl na Ústavu fyziky plazmatu AV ČR vyroben nový generátor, na principu mnohokanálového impulsního výboje. Tento zdroj dokáže generovat jednoduchou rázovou vlnunebo pomocí kompozitní elektrody rozdělené na dvě části dvě po sobě následující rázové vlny s určitým zpožděním (tandemové rázové vlny). První vlna způsobí v relativně akusticky homogenním prostředí akustickou nehomogenitu v okolí ohniska a druhá vlna se na této nehomogenně odrazí či absorbuje (analogicky jako u litiázy)a může rozdrtit nádor (v našem případě buňky J-JHAN).

Podobně jako červené krvinky představují T-lymfocyty jednoduchý model pro ověření účinků dvou tlaků v ohnisku. U T-lymfocytů je hodnocena jejich životnost po aplikaci rázové vlny jednoduché i tandemové. Tato životnost je vztahována k různým počtům rázů. Počet přeživších buněk je určen pod světelným mikroskopem v Bürkerově komůrce. Ve výsledcích je také porovnávána účinnost rázové vlny jednoduché a rázové vlny tandemové na buňky J-JHAN.

2. Teoretická část

2.2 Neinvazivní litotrypse

Litotrypse extrakorporální rázovou vlnou – LERV (Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy - ESWL) je poměrně novou metodou dezintegrace především močových, málokdy žlučových konkrementů. [2] Akustická energie na rozdíl od jiných druhů energie dokáže snadno a do jistého prahu bez poškození pronikat měkkými tkáněmi a je možné ji lokalizovat. [7] Díky úspěchům litotryptoru dochází k dalším výzkumům tohoto terapeutického přístroje například na nádorovou tkáň. [2]

Mechanické účinky rázových vln slouží k rozmělnění konkrementů v pacientově těle na písek a následnému vyloučení přirozenými cestami. Tlakový impuls s velkou amplitudou je generován mimo tělo pacienta a přes fokusační soustavu se jeho energie soustředí do kamene. Akustická energie na rozdíl od jiných forem energie se šíří s relativně malou ztrátou energie, tlakový impuls prochází vodou a měkkými tkáněmi až ke kameni. [2] Všeobecně je potřeba několik set rázových vln k úplné fragmentaci kamene. Fragmenty musí být menší než 2 mm, aby mohli projít přirozenými cestami. [1]

2.1.1 Historie rázových vln

V 70. letech minulého století pracovníci leteckého průmyslu firmy Dornier sledovali modelově účinkem rázových vln údery dešťových kapek na části křídel nadzvukových letadel. Při náhodném průchodu rázové vlny tkání se zjistilo, že výkon a tlak, který poškodí kov, nezpůsobí poškození tkání. [14]

Následovaly pokusy na zvířatech o účinku tlakových vln na tkáň, prováděné firmou Dornier ve spolupráci s výzkumným ústavem chirurgie univerzity v Mnichově. První prototyp litotryptoru byl úspěšně použit k fragmentaci lidských konkrementů, které byly voperovány psům. První litotrypse ledvinových kamenů u člověka byla provedena v roce 1980 litotryptorem typu HM - 1 (Human Model – 1). Vývoj dalšího prototypu HM - 2 probíhal v roce 1982. V roce 1983 následovalo uvedení do provozu

prvního sériově vyráběného litotryptoru. Byl to litotryptor typu HM - 3, který byl založený na elektrohydraulickém zdroji. Pacient musel být ponořen v nádrži plné vody, která byla kontinuálně odvzdušňována (kvůli negativně působícím vzduchovým bublinám). Je to jeden z nejefektivnějších litotryptorů dodnes. [14] Firma Dornier uvedla na trh ještě další typ HM – 4, založený na elektromagnetickém či piezoelektrickém zdroji. Výhodou možnost provádění litotrypse buď bez anestezie, nebo pouze s minimální anestezií, a také lze litotrypsi provádět bez celkové vodní lázně. Ale výsledky ukázaly, že tento typ litotryptoru má horší terapeutické účinky než předchozí HM – 3. [3]

Další vývoj lithotryptorů přinesl tzv. „suchou“ litotrypsi. Ta spočívá v tom, že do terapeutické hlavice vyplněné vodou, která je uzavřena tenkou silikonovou membránou, je zabudován zdroj rázových vln. Voda je také kontinuálně odvzdušňována a cirkuluje v aplikační hlavici litotryptoru. Pomocí gelu se dostává silikonová membrána do kontaktu s tělem. Tento druh litotrypse má některé fyzikální problémy, jelikož silikonová membrána a bublinky obsažené v gelu jsou překážkou pro šíření rázových vln. Ačkoli není z technického hlediska nejvýhodnější (litotryptor typu HM - 3 s celotělovou lázní nebyl z pohledu dokonalosti akustického kontaktu předčen), v dnešní době akustických gelových membrán hojně využíván díky praktičnosti. [16]

V České republice se provádí litotrypsy od roku 1987 a nejrozšířenějším litotryptorem je zde generátor z přístroje Medilit. [14]

2.1.2 Další vývoj

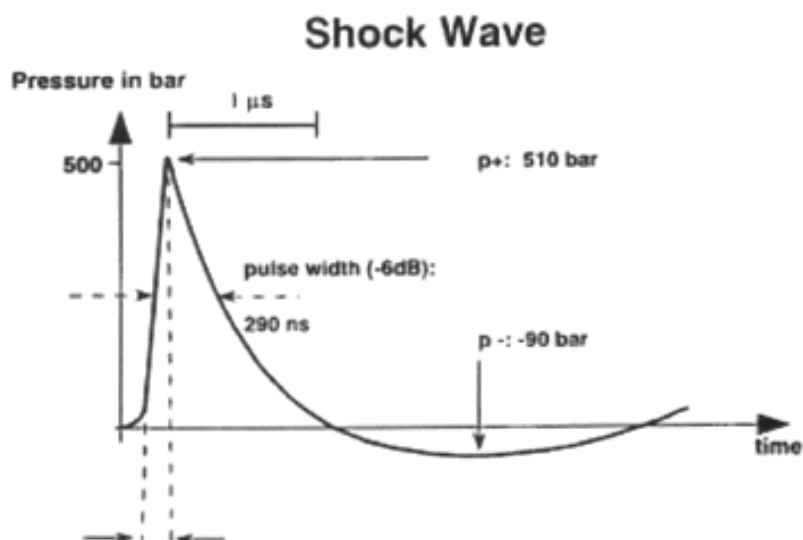
Od doby uvedení LERV na trh bylo vyvinuto více než 60 různých variant litotryptorů. Snaha byla vždy co nejvíce snížit riziko poškození okolních tkání a zlepšit desintegraci konkrementu, ale základní principy se neměnily. [1] Abychom docílili snížení rizika poškození tkání a tím pádem i jizvení ledvin, musí dojít k zúžení ohniskové zóny. Proto je hlavním trendem u nejnovějších přístrojů co nejúžší ohnisková zóna. [3]

2.1.3 Anestezie

Původní litotryptor typu HM – 3 způsoboval silnou bolest, proto bylo nutné uvést pacienta do celkové nebo regionální anestezie. Jelikož k desintegraci kamínku není potřeba tak silného litotryptoru jako byl nemodifikovaný litotryptor HM – 3, začaly se vyrábět „slabší“ litotryptory, kde se tlaky a především plošná hustota výkonu snížily. Pomocí zvětšení apertury hlavičky byla umožněna litotrypse bez anestezie. Pocit bolesti je zmenšen tím, že na jednotku kožního povrchu díky zvětšené apertuře nepůsobí tak velké množství energie. V dnešní době se díky pokroku anestezie litotrypse provádí za krátkého působení analgetik a hypnosedativ. [3]

2.1.4 Fyzikální princip

Každý se již setkal s tlakovými vlnami v přírodě, které mají vlastnosti rázové vlny - např.: úder blesku, exploze bomby. Z fyzikálního hlediska se jedná o akustickou vlnu, vznikající v prostředí jako je voda nebo vzduch, při pohybu objektu. Pohyb vyvolá lokální kompresi a současně zředění molekul prostředí, přičemž na čele objektu vzniká zóna komprese a za ním zóna zředění s podtlakem. Proto rázová vlna z počátku nabývá vysokých hodnot kladného akustického tlaku a její druhá půlvlna se stává zápornou a je relativně mělká. Křivka tedy začíná prudkou vzestupnou fází nazývanou šok (hodnoty tlaku 40 -110 MPa), který trvá 5 ns, a poté během 1 μ s klesne na nulu a následuje negativní fáze trvající 3 μ s (Obrázek 1.). U různých druhů litotryptorů se tvar křivky příliš nemění, mohou se lišit pouze amplitudou nebo prostorovou distribucí a hloubkou negativního tlaku. Rázová vlna je pouze ta akustická vlna, která vznikla vlivem vysoce energetického impulsu, ztratila sinusoidální tvar křivky a dosáhla určité vzdálenosti (šokové vzdálenosti), ve které se transformovala na rázovou vlnu, díky vysoké rychlosti šíření médii. Většina akustických vln zaniká dříve než dosáhne šokové vzdálenosti. [16]

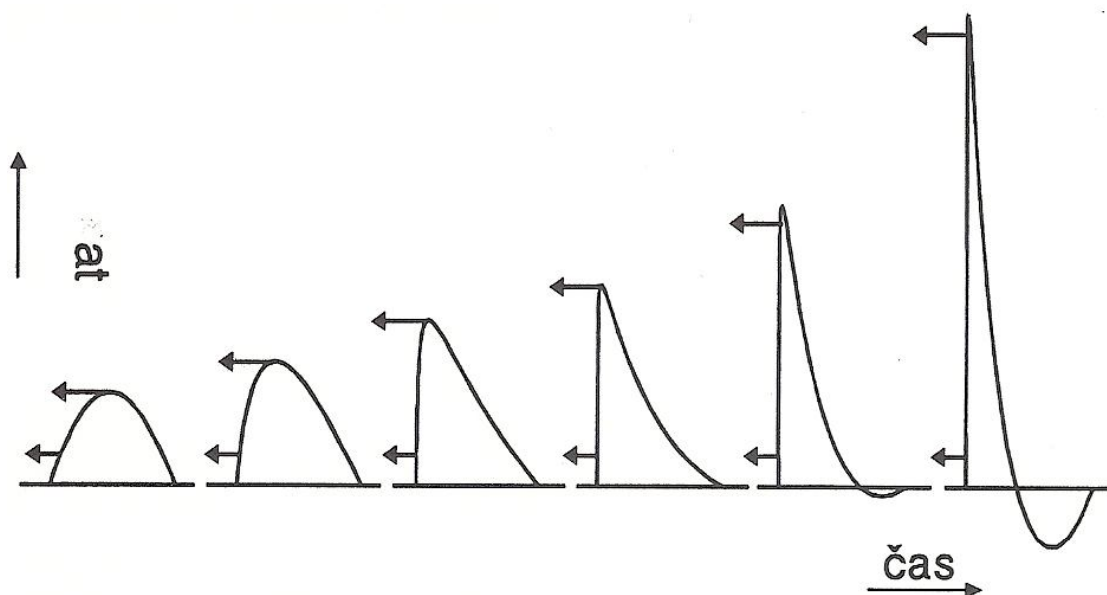


Obrázek 1 Průběh rázové vlny [18]

Rychlost šíření akustické vlny prostředím je závislá na vlastnostech media (na hustotě, pružnosti a teplotě media). Ve vodě se šíří pomaleji než-li v pevném tělese, při vyšší teplotě se šíří rychleji. Rychlost rázové vlny závisí také na tlaku: čím vyšší tlak, tím větší rychlost. [1]

Rychlost jakékoli mechanické vlny se mění s hustotou média. Například ve vodě se vlna šíří rychleji než ve vzduchu. Stejně je tomu i naopak, hustota média se mění s průchodem vlny skrz médium. Zpočátku se kvůli náhlé kompresi média se tvoří rozlehlý pozitivní pulz. Tento tlakový pulz se při průchodu médiem (vodou) mění. [1]

Při malých amplitudách změn hustoty se zvuk šíří konstantní rychlostí. Za normálních podmínek pro malé amplitudy změn hustoty a tlaku platí, že vztah mezi tlakem a hustotou v přenosovém médiu je lineární. Tento vztah přestane platit ve chvíli, kdy dojde k velkému lokálnímu zvýšení tlaku a hustoty, prostředí bude méně stlačitelné a s rostoucím tlakem poroste rychlost zvuku. Díky této nelinearitě se mění tvar tlakového pulzu při průchodu prostředím (Obrázek 2). Pokud tlakový impulz dosahuje dostatečně velké amplitudy, mění se na útvar se skokovým nárůstem tlaku, nazývaný rázovou vlnou. Hlavními charakteristikami rázové vlny jsou amplituda a doba nárůstu tlaku (t_R - risetime). Doba nárůstu tlaku je čas, za který dojde k nárůstu tlaku z 10 % na 90 % maximální hodnoty. [7]



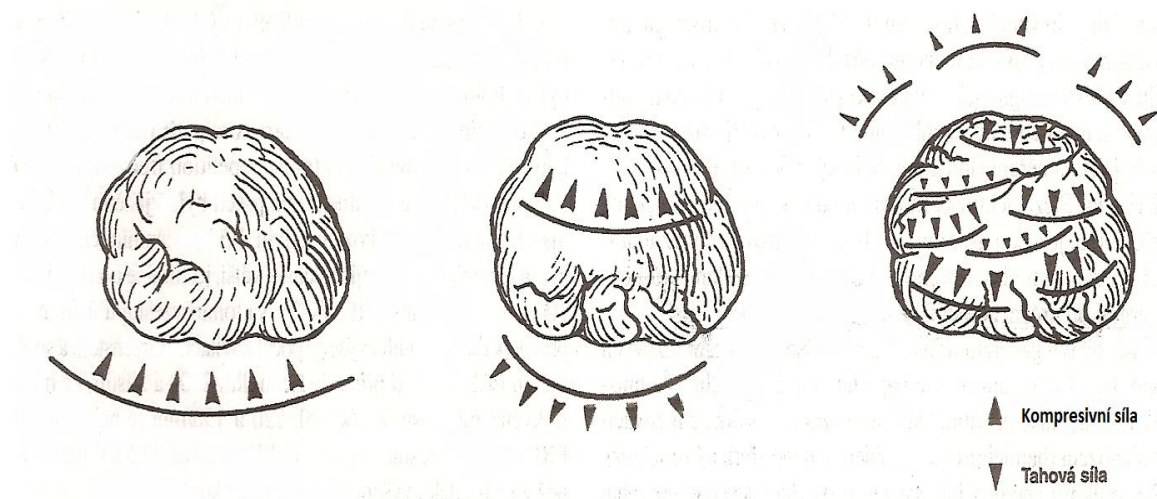
Obrázek 2 Schéma vzniku rázové vlny [2]

2.1.5 Fragmentace konkrementu

Rázová vlna, působící na rozhraní dvou prostředí s odlišnou impedancí, vytváří tlakové změny, díky kterým vznikají destrukční síly. Impedance močových kamenů je až 10x vyšší než impedance okolní tkáně a tekutin. Při přechodu mezi vodou a konkrementem dochází ke ztrátě energie 5 – 25 %, na rozhraní voda – kost činí ztráta 50 – 60 %, na rozhraní voda – vzduch 99,9 % energie. Tyto rozdíly se týkají jak šíření akustické energie u rázových vln, tak i šíření malých intenzit při provádění sonografického vyšetření. Proto k zobrazení tkání nebo i konkrementů musíme vždy použít směru, ve kterém není vzduch, který, jak bylo uvedeno, z reflexe nedovolí šíření akustické energie dále. Proto je k zaměřování konkrementů stejně jako u ultrasonografie například pro kardiologické vyšetření využíván pojem „akustického okna“ solidní tkáně, což je oblast solidní tkáně, od které může být zobrazen požadovaný nález.[14]

Ve chvíli, kdy rázová vlna narazí na konkrement, část energie se odrazí zpět ke zdroji (odražená vlna), část se absorbuje a zbytek se šíří dál (progresivní vlna). Princip fragmentace konkrementu je následující: Rázová vlna generuje na rozhraní vody a konkrementu kompresivní sílu, ta tvoří laterální pnutí. Dále vzniká tahová síla z odražené vlny. Další tahovou silou je drolení (spalling), vznikající při průchodu rázové vlny rozhraním s různou impedancí na zadním povrchu kamene. Síla je o to

větší, čím větší je rozdíl impedancí. Další síly, rozrušující konkrement, vznikají při odrazu tahové složky vlny od zlomů ve struktuře kamene. Pokud inherentní síly udržující solidní objekt pohromadě jsou menší než síly vyvolané rázovou vlnou, dochází k desintegraci konkrementu. Tahové a kompresivní síly jsou ukázány na obrázku 3.[3]



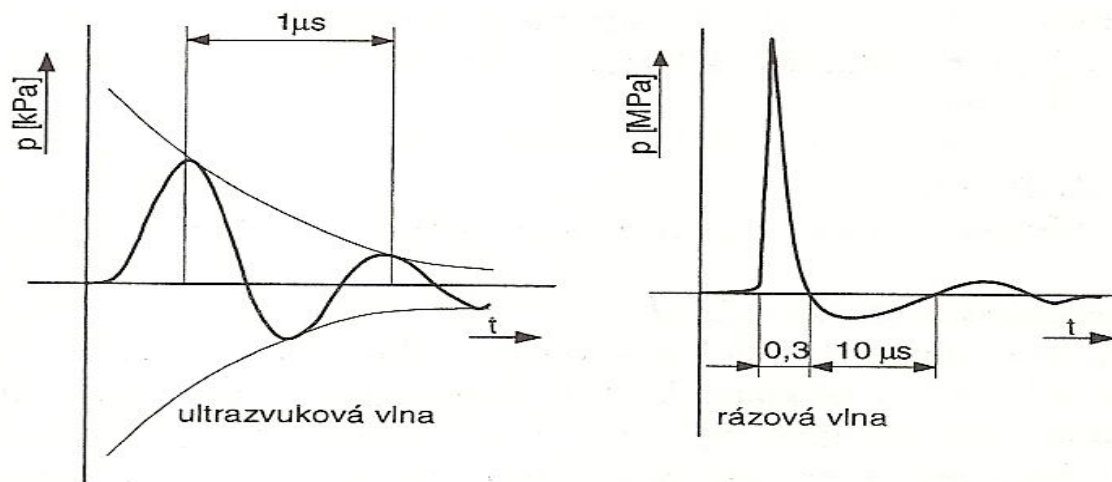
Obrázek 3 Princip desintegrace konkrementu [3]

Fragmentaci konkrementu také významně pomáhají kavitace, podle některých studií jsou dokonce nejdůležitější silou, pomocí které dochází k destrukci konkrementu. Na povrchu kamínku se nacházejí mikroskopické bubliny. Vlivem rázové vlny na bubliny dojde k jejich expanzi a kolapsu. Díky těmto změnám vzniká drobný proud tekutiny. Ten tvoří na povrchu kamínku místní tlak, který dává vzniku drobným jamkám především na nerovném povrchu. Splýváním jamek dochází k desintegraci kamene. [3]

2.1.6 Porovnání rázových a ultrazvukových vln

Rázové vlny sdílejí vlastnosti s obvyklými ultrazvukovými vlnami, nicméně v některých základních principech se liší. Hlavní rozdíl mezi rázovou a tlumenou ultrazvukovou vlnou je vidět na Obrázku4. [1] Tlaková křivka ultrazvukové vlny má sinusový průběh se střídáním pozitivní a negativní vlny o určité vlnové délce. Rázová vlna má průběh neharmonický, nelineární, aperiodický a dochází u ní k rychlému nárůstu tlaku za krátký čas. [14] Nelinearita vede ke zkreslení sinusoidálního tvaru

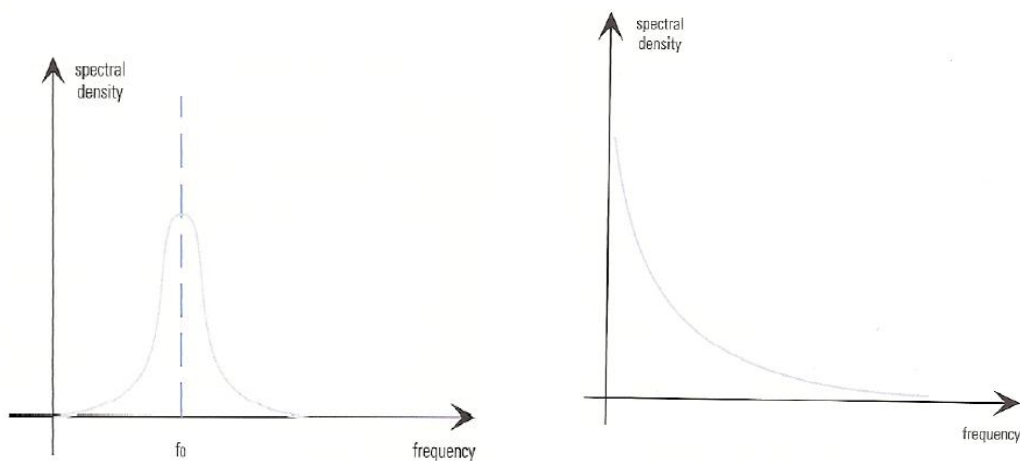
křivky. [13] Rázová vlna se oproti tlakové vlně šíří prostředím osaměle jako jediný mohutný tlakový kmit za velmi krátkou dobu. [12]



Obrázek 4 Srovnání průběhů tlaku ultrazvukové a rázové vlny [5]

U rázové vlny je velmi důležité, že její pozitivní půlvlna má mnohem větší amplitudu než negativní půlvlna. Pozitivní půlvlna působí po průniku měkkými tkáněmi destruktivně na kámen. [1] U ultrazvukové vlny můžeme také pozorovat pozitivní (stlačení) a negativní část (podtlak). Negativní část způsobuje nežádoucí účinky vysokointenzivního ultrazvuku na tkáň, pokud již negativní tlak překročí kavitační práh. Kavitace tvorbou dutinek, které rychle adiabaticky kolabují, je považována za hlavní příčinu nežádoucích účinků vysokointenzivního ultrazvuku. Diagnostické přístroje využívají ultrazvuku o nízkých intenzitách (výrazně nižších), tudíž nedochází k vedlejším účinkům, nebo alespoň doposud nebyly prokázány. [9]

Frekvenční oblast rázové vlny je mnohem širší než u ultrazvukové vlny. Ultrazvukové vlny mají charakteristickou frekvenci, zatímco rázové vlny jsou složeny ze spousty frekvencí. Tomu se říká frekvenční spektrum rázové vlny, jeho rozmezí je od 20 kHz do několika MHz (Obrázek 5.). Dříve se prováděli experimenty extrakorporální fragmentace močového kamene pomocí ultrazvukových vln, nicméně klinická aplikace nebyla uskutečněna kvůli malé hloubce penetrace ultrazvukové vlny (hloubka penetrace závisí na frekvenci) ve tkáni a riziku termálního poškození tkáně. Výhodou rázových vln oproti ultrazvukovým je, že při průchodu lidskou tkání nedochází tolik k jejich zeslabení. [1]



Obrázek 5 Porovnání frekvenčního spektra ultrazvukové vlny (vlevo) a rázové vlny (vpravo) [1]

2.1.7 Tandemová RV

Zlepšení fragmentace kamene použitím tandemové rázové vlny je založeno na faktu, že kolaps mikrobublin, umístěných poblíž konkrementu, může být zesílen rychle následující druhou rázovou vlnou. Časové zpoždění druhé vlny za první by mělo odpovídat času kolapsu shluku bublin, vytvořených první rázovou vlnou. Experimenty ukázaly, že druhá rázová vlna může dosahovat nižšího tlaku oproti první a přesto být efektivní pro zlepšení desintegrace konkrementu. Můžeme měnit pole kavitace změnou délky času mezi pulzy, bez toho aniž bychom změnili amplitudu tlaku. Z toho plyne, že poškození tkání rázovou vlnou je možné regulovat dobou mezi prvním a druhým pulzem. [1]

Dvě rázové vlny generované za sebou v časovém úseku 67 ms způsobí zvýšení hemolýzy červených krvinek. To se stane proto, že první vlna vytvoří jádro akustické nehomogenity, kde již nastává změna akustických vlastností tekutiny v ohnisku a do doby než zmizí toto ztlačení, přijde druhá vlna, která považuje akustickou změnu za jakýsi „odpor“, kde se může její energie uvolnit (popsanou absorpcí a reflexí)..[1]

Nevýhodou těchto litotryptorů je, že potřebujeme dva generátory rázových vln nebo různě konstruované reflektory pro krátký požadovaný čas mezi první a druhou vlnou. Řešením byl nejprve vývoj piezoelektrického systému tak, aby generoval dvě rázové vlny s nastavitelným časem zpoždění mezi 50 a 950 μ s. Při malém časovém

zpoždění druhý pozitivní pulz potlačí růst bublin. Tudíž kolaps bublin není tak intenzivní a dochází ke snížení účinnosti. Pokud přijde druhý pulz až po kolapsu bublin, nedojde k žádnému dodatečnému poškození kamene. [1]

Je možné, že v budoucnosti se objeví takový litotryptor, u kterého budeme moci určit vyhovující časová zpoždění v závislosti na velikosti, umístění a chemickém složení konkrementu. Nicméně skutečnost, že odraz vlny od kamene ovlivňuje dobu kolapsu mikrobublin, ukazuje, že je těžké určit optimální časové zpoždění. Navíc povrch kamene se mění během léčby a u různých pacientů je odlišný. [1]

2.1.8 Části litotryptoru

Každý přístroj má 4 části: 1) generátor rázových vln, 2) fokusovací zařízení (akustické čočky, akustické reflektory), 3) vazebné prostředí (voda), 4) zařízení pro přesné zaměření kamene. [10]

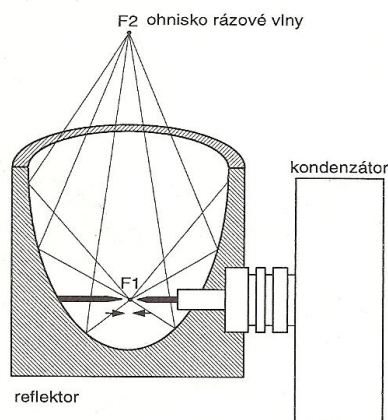
- *Generátory*

Generují rázovou vlnu mimo tělo pacienta a soustředí ji do močového konkrementu. K soustředění energie do močového kamene slouží u každého litotryptoru fokusační soustava. Elektrický obvod je u všech druhů generátorů podobný: dojde k nabití vysokonapětového kondenzátoru a následnému rychlému vybití. [1] Podle způsobu vzniku rázových vln můžeme generátory dělit na tři nejpoužívanější druhy: elektrohydraulický, piezoelektrický a elektrodynamický. Tyto generátory poskytují rázové vlny s různými vlastnostmi. Výběr fokusační soustavy závisí na tvaru primární rázové vlny (kulová, rovinná, cylindrická). Častěji používané jsou akustické reflektory oproti akustickým čočkám. Další dělení generátorů je na bodové (elektrohydraulické) a plošné (elektromagnetické, piezoelektrické). [2]

Generátor je nejdůležitější část litotryptoru určuje cenu, efektivitu fragmentace, rozsah poškození okolní tkáně a potřebu anestezie. Typ generátoru určuje také velikost ohniskové, což ovlivňuje rozsah poškození ledvin. [1]

➤ Elektrohydraulický (jiskrový) generátor

Tlakový impulz v tomto generátoru vzniká výbojem ve vodě mezi dvěma hroty elektrod. Při průchodu proudu vytvoří plasmatický kanál, který prudce ohřeje okolí na vysokou teplotu a způsobí expanzi kapaliny, ve výbojovém kanálu vzniká vysoký tlak. Rychlost šíření rázové vlny závisí na tlaku, na čele RV dochází k nárůstu tlakového skoku. Výbojový kanál si můžeme představit jako bodový zdroj, tlakový impulz šířící se z něj, je možno chápat jako kulovou vlnu, jejíž amplituda tlaku klesá se čtvercem vzdálenosti. Jiskřiště je uloženo v místě primárního ohniska kovového elipsoidního reflektoru. Díky vodnému prostředí dochází k částečné přeměně elektrické energie na akustickou energii rázové vlny. Podle tvaru a velikosti fokusačního elipsoidu se mění rozměry ohniska, v němž dochází k desintegraci kamene. Toto ohnisko má tvar protáhlého oválu. Schéma elektrohydraulického generátoru můžeme vidět na obrázku 6. [2]



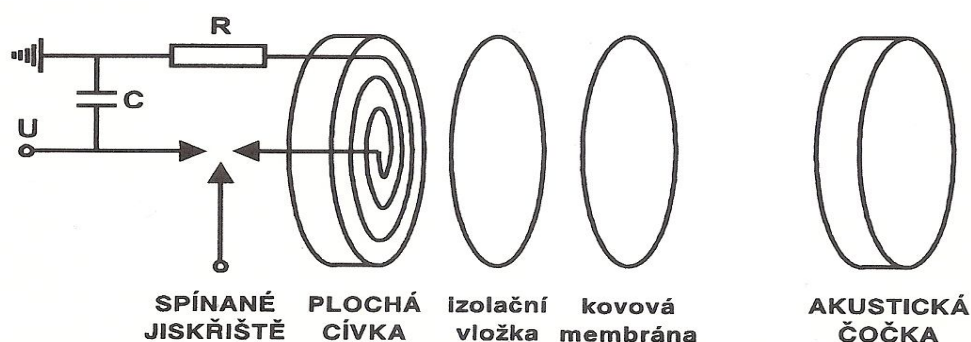
Obrázek 6 Elektrohydraulický generátor [5]

Tento druh generátoru má kratší dobu nárůstu tlaku než elektromagnetický nebo piezoelektrický generátor, je to přibližně 30 ns. Nevýhodou je, že pouze 5 % celkové energie se dostane až ke kamínku, z čehož plyne, že tento systém není příliš efektivní. Efektivita desintegrace závisí na tvaru reflektoru a na tvaru elektrody. Na druhou stranu má ale elektrohydraulický generátor spoustu výhod, jako například velkou rychlost expanze plazmy, relativní jednoduchost generátoru a nízkou cenu. [1]

Jelikož se jiskřiště jak tepelně tak i mechanicky opotřebovává, je snaha zvyšovat jeho životnost. Firma Dornier vyrobila litotryptory s pevným jiskřištěm, firma Technomed zase s posuvnými drátovými elektrodami. Nejnovějším pokusem je jiskřiště s komolými elektrodami uzavřenými v gumovém vaku, který je vyplněn elektrolytem. [2] Prozatím, i když jsou hroty elektrod vyrobeny z odolných materiálů, je potřeba hroty pro každého pacienta vyměňovat a zabrušovat na vrcholový úhel 50° . Počet rázů při jednom výkonu nesmí překročit 6000. [5]

➤ Elektrodynamický generátor

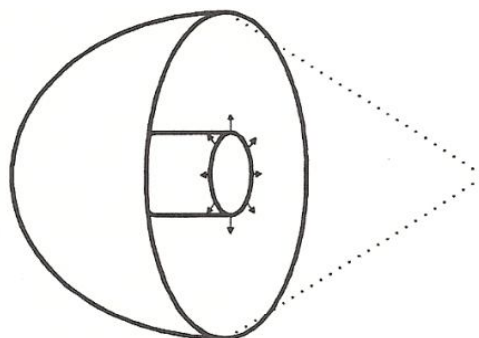
V tomto případě se jedná o rovinnou rázovou vlnu, která vzniká pomocí ploché cívky přiléhající na kovovou membránu. Jakmile dojde k průchodu proudového impulsu cívkou, vznikne magnetické pole, jehož tlak se pohybem kovové membrány přenáší do vodního sloupce jako rovinná tlaková vlna. Zpočátku se nejedná o rázovou vlnu, tou se stává až při průchodu vodním sloupcem poté, co prošla fokusačním zařízením. Jako fokusační prvek se v tomto případě používá plastová akustická čočka. Schéma elektrodynamického generátoru ukazuje obrázek 7. [2]



Obrázek 7 Elektrodynamický generátor [2]

Další typ elektrodynamického generátoru byl vyvinut ve Švýcarskou firmou Storz. U tohoto generátoru je membrána ve tvaru válce. Oproti prvnímu příkladu se zde akustické impulsy rozbíhají paprscitě, fokusace probíhá přes parabolický reflektor, který transformuje válcovou vlnu na kulovou, ta je koncentrována do ohniska. Tlaková

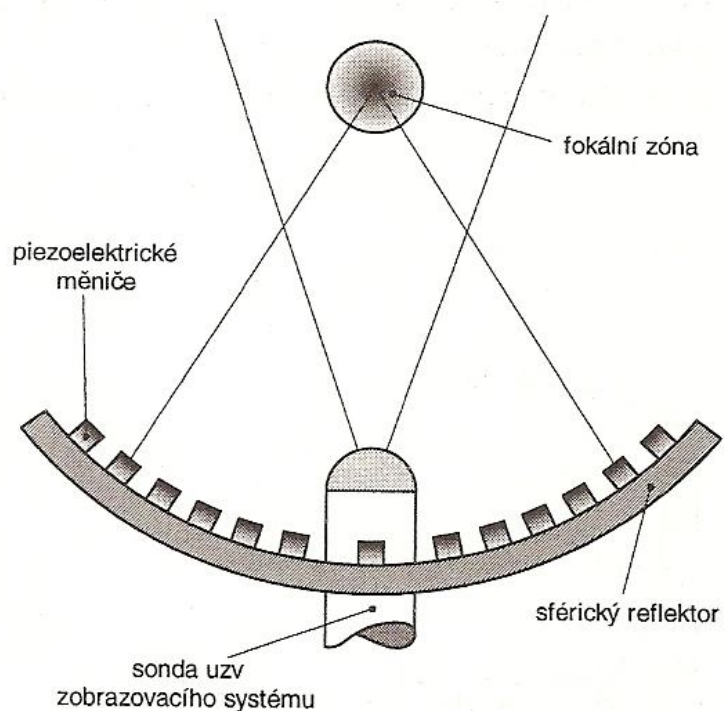
vlna se přemění na rázovou vlnu při fokusaci. Výhoda tohoto typu litotryptoru je v tom, že se dá používat i u obézních lidí, jelikož ohnisko je situováno relativně daleko od generátoru. Schéma tohoto generátoru vidíme na obrázku 8. Storz ještě vynalezl další druh generátoru, kde uživateli umožněno měnit velikost ohniska přímo během léčby. [1]



Obrázek 8 Elektrodynamický generátor s kmitající válcovou plochou [2]

➤ Piezoelektrický generátor

Na ploše dutiny kulového vrchlíku jsou rozloženy stovky piezoelementů. [2] Piezoelektrické elementy jsou schopné převést tlak na elektrický proud nebo převést elektrický signál na mechanický pohyb. V tomto případě transformují napěťové změny na proměnlivé kmitání média. Při vysokonapěťovém pulzu piezoelektrické krystaly expandují pár mikrometrů po jejich longitudinální ose. Piezoelektrické litotryptory vyžadují malý rychlý kmit při vysokém napětí okolo 5 – 10 kV. Elektrický pulz způsobí expanzi krystalů, která vyvolá tlakovou vlnu. Generátor je uložený extrakorporálně ve vodě ohřáté na tělesnou teplotu. Celé je to uzavřené gumovou membránou, která přichází do styku s pokožkou pacienta za použití vodivého gelu. [1] Ke vzniku rázové vlny dochází při superpozici synchronního kmitu všech piezoelektrických elementů. Rozměr ohniska je zde velmi malý, tlak narůstá pomaleji. U těchto přístrojů můžeme opakovaně pracovat s vysokou frekvencí. Jedná se o méně bolestivé rázy (skoro bezbolestné) díky velkému úhlu apertury a nízkým amplitudám v povrchové inervované vrstvě těla. Bohužel nízké tlaky a pomalejší nárůst tlaku snižuje jejich schopnost fragmentace. Obrázek 9 ukazuje schéma piezoelektrického generátoru. [2]



Obrázek 9 Piezoelektrický generátor [5]

➤ Mikroexplozivní generátor

Podobně jako elektrohydraulické generátory používají mikroexplozivní generátory k fokusaci elipsoidního reflektoru. Nicméně v tomto případě je rázová vlna tvořena malou olověnou kuličkou, která je odpálena z ohniska F1. Pak už je stejně jako u elektrohydraulického generátoru rázová vlna fokusována přes reflektor do ohniska F2. Kvůli obavám z exploze se však od této metody upustilo. [1]

➤ Porovnání litotryptorů

Rozměry ohniska u elektrohydraulických generátorů jsou velké, u piezoelektrických jsou malé. Po mnoho let se vedou diskuze mezi odborníky, jestli jsou lepší malé nebo velké rozměry ohniska pro fragmentaci konkrementu a pro vedlejší účinky. Ve velikosti amplitudy (vrcholu) tlakové křivky je většina

piezoelektrických generátorů někde mezi elektrohydraulickými a elektromagnetickými. Některé společnosti se pokusily snížit počet rázů a snížit riziko poškození tkáně zvýšením amplitudy tlaku a zmenšením velikosti ohniska. S litotryptory s velkou aperturou (malou velikostí ohniska), dobrým zobrazovacím systémem, precizní polohou pacienta a zkušeným personálem se dá dosáhnout dobrých výsledků, protože malá ohnisková zóna povolí pouze malou toleranci chyby pro zaměření kamene. Na druhou stranu pohyby způsobené dýcháním mohou měnit polohu konkrementu až o 50 mm během rázování. Proto je u piezoelektrických litotryptorů během léčby velká pravděpodobnost, že rázová vlna nezasáhne kámen. Díky malé ohniskové zóně je však dosaženo vysoké hustoty energie v ohnisku, snižuje se riziko poškození tkáně (díky velké apertuře se snižuje hustota energie dopadající na pokožku) a zvyšuje to tedy pacientův komfort. Z toho plyne, že by bylo potřeba vylepšit synchronizaci s dýchacími pohyby a povolit rázování pouze pokud je kámen v ohniskové zóně. Vzhledem k tomu, že elektrohydraulické a elektromagnetické generátory mají větší rozměry ohniska než piezoelektrické, dá se teoreticky předpokládat, že poškození ledviny bude rozsáhlejší. Avšak bylo dokázáno, že mezi těmito třemi systémy není významný rozdíl v poškození tkání. [1]

Cílem některých firem bylo zvětšit amplitudu tlaku pozitivní půlvlny a zmenšit ohnisko. Eisenmenger testoval přístroje, které byly sestaveny přesně opačně, s rozlehlým ohniskem malou amplitudou tlaku, a dosáhl velmi dobrých výsledků. Přestože je v této době snaha zmenšit rozměry ohniska, je možné, že se firmy, vyrábějící litotryptory, budou vracet zpět k modelu Dornier HM3 a budou ho napodobovat. [1]

Je také žádoucí, aby hustota energie mohla být upravována v rámci velkého rozmezí. U elektrohydraulických generátorů při zvýšení napětí nedojde k příliš výraznému zvýšení hustoty energie. Tím pádem nedochází k výraznému nárůstu tlaku ani ke zlepšení fragmentace. Výhodou některé litotryptorů je, že jsou vybaveny snadno použitelným softwarem k dokumentaci počtu rázových vln a velikosti použité energie během rázování. [1]

- *Fokusační zařízení*

Toto zařízení má za úkol soustřeďovat energii rázové vlny do požadovaného bodu. Pokud by nebyla rázová vlna fokusována do jednoho místa, docházelo by k významnému poškození okolních tkání. [3]

Existují dva druhy fokusace, pomocí reflektoru nebo pomocí akustické čočky. Typ fokusace závisí na zvoleném generátoru. Generátory s bodovým zdrojem (elektrohydraulické, jiskrové, mikroexplozivní, laserové) využívají k fokusaci reflektoru. V ohnisko F1 je umístěn zdroj a vlny jsou fokusovány do ohniska F2. Naproti tomu generátory s plošným zdrojem (elektromagnetické, piezoelektrické) soustřeďují energii do ohniska F1. Elektromagnetický generátor využívá buď reflektoru, nebo akustické čočky. U piezoelektrického generátoru jsou piezoelementy uloženy na povrchu sférického miskového reflektoru a tím je docíleno fokusace do ohniska F1. [3]

- *Vazebné prostředí*

Vazebné prostředí je potřebné k tomu, aby vlny procházely do pacientova těla s minimální ztrátou energie. Jako vazebné prostředí je využíváno vody, jelikož má podobnou akustickou impedanci jako měkké tkáně, takže při přechodu mezi těmito dvěma rozhraními prakticky nedojde k úbytku energie. Dříve se používala vodní lázeň, dnes se využívá membrány, která je v přímém kontaktu s pacientovou pokožkou za použití gelu a bez přítomnosti vzduchu. [3]

- *Způsob zacílení a zobrazování*

Pro efektivní LERV (litotrypsi extrakorporální rázovou vlnou) musí být možné zaměřit ohniskovou zónu co nejpřesněji do místa, kde se nachází kámen. Aby rázová vlna nenarazila na kosti, plíce či střeva musí být zaměřena do anatomického okna. [1]

Monitorování je možné dvojím způsobem, buď rentgenovou skiaskopickou, nebo ultrazvukovou metodou. Skiaskopické zobrazení je možné přímo, neboť 95 % konkrementů je RTG kontrastních. Při zaměření některých ledvinových

konkrementů, ale spíše pro litiázu ve žlučových cestách je možnost použití kontrastní látky, a tím je snadnější lokalizace konkrementu. Nevýhodou ale je vystavení radiační zátěži pacienta i personálu a nákladná údržba. Ultrazvukové metoda umožňuje zobrazení v reálném čase, můžeme tedy během léčby pozorovat proces fragmentace. Další výhodou této metody je, že vylučuje radiační zátěž. Na druhou stranu ale bývá často složité zaměřit uretrální konkrement (hlavně při používání litotryptoru s malým ohniskem), proto je potřeba zkušeného operátora. Další problém nastává u obézních pacientů. [3]

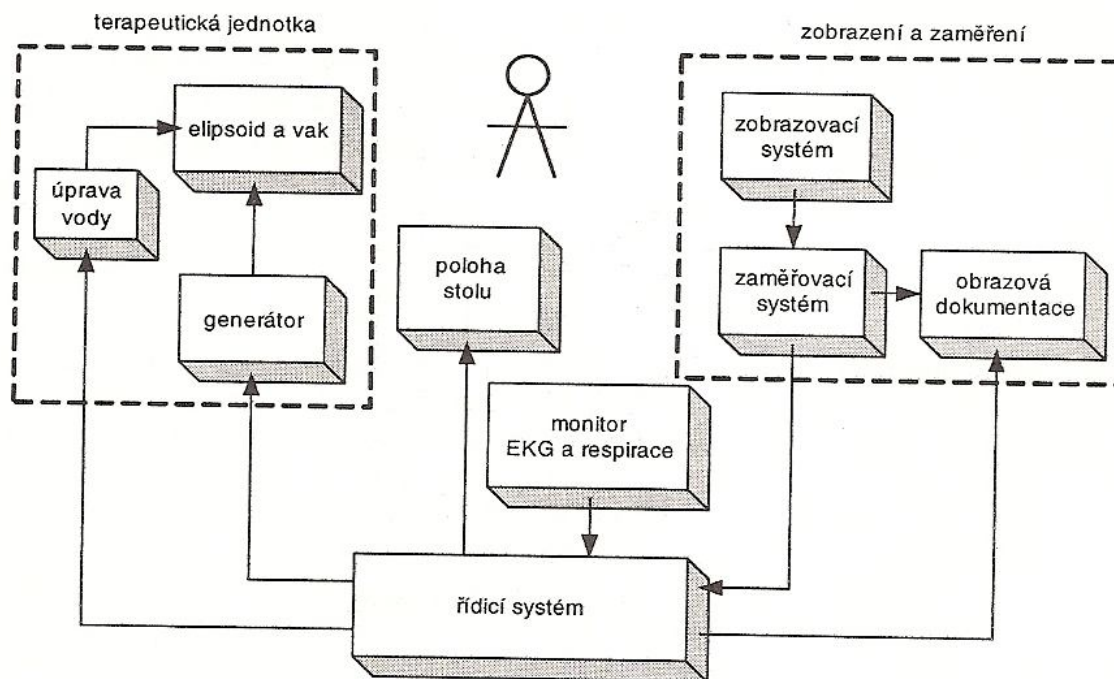
- *Ideální litotryptor*

Litotryptory se liší ve vzhledu, ve výkonu, v ceně, ve spolehlivosti, v nákladech na údržbu, v efektivitě fragmentace a v rozsahu poškození okolní tkáně. [1]

Ideální litotryptor by měl být levný, jeho použití jednoduché, měl by být vysoce kvalitní, s nízkou cenou údržby a měl by zajišťovat efektivní fragmentaci s minimálním poškozením tkání. Nicméně přímé porovnání výkonu litotryptorů není možné, protože jsou používány různé definice pro pojem efektivita. Některé společnosti definují efektivitu jako „levný, pro pacienta úspěšný lékařský výkon s minimálními vedlejšími účinky“. Jiná definice pro efektivitu litotryptoru je „efektivita fragmentace konkrementu“. Technické charakteristiky a klinické výsledky mohou být prezentovány tak, že skoro žádný litotryptor nemůže být lepší než jiný. [1]

2.1.9 Technické řešení

Systém LERV sestává ze čtyř základních funkčních bloků: terapeutická jednotka, jednotka zobrazení a zaměření, monitor pro sledování signálu EKG a dechové křivky a řídicí jednotka. Toto technické řešení je pro elektrohydraulický generátor, jelikož je nejrozšířenější. Na obrázku 10 můžeme vidět blokové schéma.[5]



Obrázek 10 Blokové schéma systému LERV [5]

Části terapeutické jednotky jsou elipsoidní reflektor s jiskřištěm a vakem, generátor a systém na odplynění a ohřev vody. Jednotka zobrazení a zaměření umožňuje zaměřit konkrement alespoň ve dvou rovinách tak, aby byl v ohnisku F2. Zobrazovací jednotkou je buď C - rameno, nebo ultrazvuk s možností náklonu sondy. Monitor pro sledování EKG signálu a dechové křivky je důležitý proto, aby docházelo k synchronizaci výbojů s vlnou R ve fázích výdechu. Řídící jednotka umožňuje ovládání činnosti systému úpravy vody, budícího generátoru, ovládá nastavení hrotů jiskřiště, nastavení polohy stolu, na kterém pacient leží, dále počet rázů, synchronizace se signálem EKG a dýcháním. [5]

2.1.10 Léčba rázovou vlnou

Hlavním příznakem pro diagnózu ledvinových kamenů bývá nesnesitelná bolest, krev v moči. Při rozhodování, jak řešit konkrement, je důležitá jeho velikost a riziko obstrukce močových cest. Kámen větší než 8 mm nemůže projít spontánně močovými cestami ve více než 90 % případů. Ideální velikost kamenů pro léčbu rázovou vlnou je do 2,5 cm. K odstranění konkrementu o velikosti 1 cm dojde s pravděpodobností 90 %, s

do velikosti 2,5 cm s pravděpodobností 70%. Drcení žlučových kamenů pomocí rázové vlny je vhodné pouze ve 20 % případů. [11]

Účinků rázové vlny se nevyužívá pouze k drcení močových kamenů, nýbrž také k terapeutickým metodám. Jak fyzikální, chemické tak i biologické účinky rázové vlny napomáhají odstranění bolesti pohybového aparátu. [15]

Biologické účinky na tkáň:

- Stimulace mikrocirkulace (krev, lymfa) a metabolismu (vasodilatace, oxidy dusíku zlepšují prokrvení)
- Zvýšení buněčného metabolismu (zvýšení permeability buněčné stěny)
- Antibakteriální a protizánětlivý účinek
- Tvorba nové tkáně (cévy, kosti)
- Zvýšená produkce kolagenu
- Uvolnění substance P (snižuje bolest, zvyšuje růst)
- Stimulace kmenových buněk

Účinky léčby:

- Analgetický účinek, tlumení bolesti (stimulace nociceptorů)
- Snížení svalového napětí
- Snižování rizika kalcifikace
- Zlepšení rozsahu pohybu
- Posílení pojivové tkáně
- Regenerace buněk [8]

Rázovými vlnami se nejčastěji léčí bolesti páteře (bederní páteře, krční páteře, Bechtěrevova choroba), bolesti horních končetin (oblast ramenního kloubu, úpony šlach v oblasti lokte – tenisový loket, oblast zápěstí, některé druhy artrózy), bolesti v oblasti pánve (křížokyčelní kloub, třísla), bolesti dolních končetin (kyčel, úpony šlach v koleni, oblast nohy, oblast paty, Achillovy šlachy). Dále napomáhá rázová vlna léčbě kloubů a kostí (pomalé hojení zlomenin, uvolnění necementové náhrady kyčelního či kolenního kloubu), odstranění bolesti měkkých tkání, léčbě chronických zánětů tíhových váčku, léčbě poranění velkých svalů, svalů paže a bérce. [15]

Kontraindikace při aplikaci na pohybový aparát

- Těhotenství
- Trombóza
- Poruchy srážení krve
- Obezita
- Akutní zánět
- Příjem léků snižujících srážlivost krve (antikoagulační léčba)

Možné vedlejší účinky:

- Pocení
- Zarudnutí kůže
- Hematom
- Bolest během léčby i po léčbě
- Nepatrné zhoršení po první léčbě [8]

2.1.11 Interakce s živou tkání a buňkami

Vliv rázové vlny na živou tkáň byl poprvé zaznamenán během 1. světové války, kdy byl objeven letec, jehož plíce byly poškozeny explozí pod vodou. Překvapivě se toto mohlo stát bez poškození jiných částí těla. Obě světové války podněcovaly studování účinku rázové vlny na lidské tělo. [1]

Při průchodu médiem může rázová vlna působit různě. Běžně způsobuje ohřev, strukturální změny, kavitaci, stlačení, krvácení, odraz a turbulenci. Ohřev je výsledkem absorpce akustické energie. Závisí na fyzikálních vlastnostech materiálu, intenzitě RV, na době trvání RV a na její frekvenci. Velký tlak může ovlivnit strukturální vlastnosti. Kavitace může produkovat volné radikály. Navíc akustické vlny způsobují rapidní stlačení a expanzi tkání. Odraz nastává ve chvíli, kdy vlna narazí na rozhraní dvou prostředí s různou akustickou impedancí. Čím větší je rozdíl mezi akustickými impedancemi dvou prostředí, tím větší část energie RV bude odražena. Na rozhraní kapalina – pevné těleso nebo plyn – pevné těleso může nastat turbulentní proudění. Vznik krevního výronu se přisuzuje ledvinovému korovému a dřeňovému krvácení,

tubulární dilataci a glomerulárnímu krvácení. Krevní výron obvykle do jednoho dne zmizí. Poranění renálních cév závisí především na napětí. [1]

Kvůli unáhlenému úsudku, že při aplikaci rázové vlny nedochází k poškození tkáně ani dlouhodobým následkům, se v 80. letech oblíbenost LERV zvyšovala. Teď již víme, že to není vždy pravdou. Díky studiím bylo zjištěno, že rázové vlny mohou způsobovat poranění tkání, destrukci cévních stěn, vznik trombů, petechie na sliznicích až drobná krvácení nebo krevní výrony. Litotryptory musí být obsluhovány vyškoleným a zkušeným lékařem. [1]

2.2 JJHAN (T- lymfocyty)

Jedná se o lidské CD4⁺T-lymfocyty. Nejčastěji se používají při výzkumu infekce HHV (herpesvirus), hlavně HHV 6, jelikož herpesviry napadají především CD4⁺T-lymfocyty. Jako model chování buněk jsou vhodné pro tento výzkum. [17]

Příkladem viru, který napadá především buňky CD4⁺T-lymfocyty, je retrovir HIV (humanimmunodeficiency virus, virus lidské imunodeficiency). HIV vstupuje do buňky pomocí molekuly CD4, která je na povrchu buněk. Poté co vir do buňky vstoupí, dojde k rychlému množení viru. Retrovirus je schopen zabudování se do buňky CD4⁺T-lymfocytu a přetrvávat zde mnoho let. Aktivace virů opakovanými infekcemi vede k uvolnění virů z CD4⁺ buněk, tím dochází k zániku těchto buněk a vir napadá další CD4⁺T-lymfocyty. Retrovirus HIV tedy způsobuje úbytek CD4⁺T-lymfocytů a následné zhroucení imunity. Z toho plyne, že na buňkách JJHAN se dá provádět také výzkum onemocnění AIDS (AcquiredImmunodeficiency Syndrome, syndrom získané imunodeficiency), způsobené retrovirem HIV.[6]

2.2.1 Lymfocyty

Lymfocyty jsou bílé krvinky, které jsou nedílnou součástí imunitního systému. Dělí se na dvě skupiny T a B. Po aktivaci antigenem se B-lymfocyty mění na plasmocyty. Tyto plasmatické buňky poté produkují imunoglobuliny (protilátky). Důležitý orgán pro tvorbu T-lymfocytů je brzlík. T-lymfocyty se dělí na další skupiny.[6]

- *T-lymfocyty*

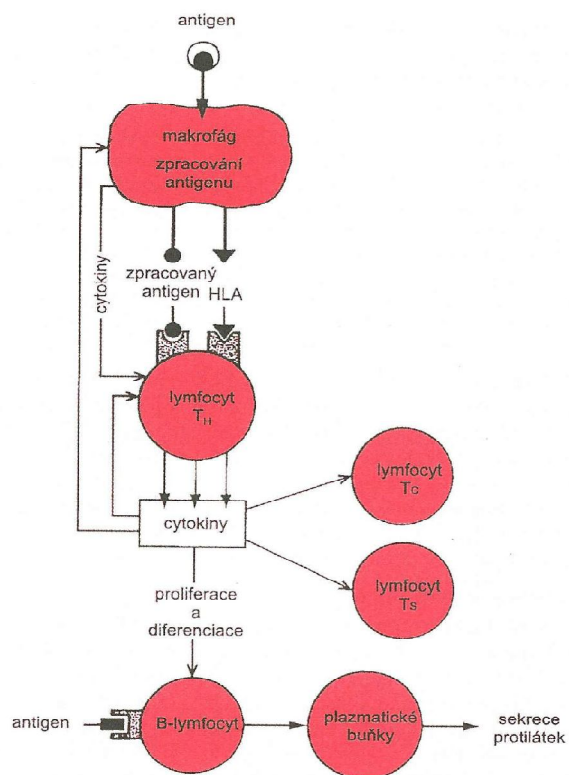
T-lymfocyty brání organismus proti infekci (hlavně proti virům), plísním, nádorovým buňkám, a jsou odpovědní za odvržení transplantátu. Po aktivaci antigenem dochází k jejich diferenciaci ve vysoce specializované efektorové buňky. Tyto buňky se poté různými způsoby účastní imunitní reakce. Rozlišujeme různé subpopulace T-lymfocytů: pomocné T-buňky T_H - (helper = pomocník), cytotoxické T_C - a supresorové T_S - jsou skupinou buněk efektorových a druhá skupina jsou T-paměťové buňky.[4]

- *Receptory T-lymfocytů*

T-lymfocyty mají dva typy receptorů. Pro rozpoznání antigenu a navázání zpracovaných proteinových fragmentů antigenu v komplexu s HLA - molekulami slouží variabilní receptory. T-buňky obsahují ještě nevariabilní proteinové CD-koreceptory, aby lépe rozpoznali molekulu HLA. CD-koreceptory se liší u pomocných T_H - a cytotoxických T_C -buněk. Prekurzorovými buňkami cytotoxických T-lymfocytů jsou T-lymfocyty nesoucí fenotyp $CD8^+$. Tyto buňky mohou rozeznat cizí antigen na povrchu těla jakékoliv buňky. Zatímco prekurzory pro pomocné T-lymfocyty jsou T-lymfocyty nesoucí koreceptory $CD4^+$. [4]

- *$CD4^+$ T-lymfocyty*

Ze všech T-lymfocytů je jich nejvíce (75 %). Účelem pomocným T-lymfocytů je vykonávat regulační funkce. Dojde-li k reakci T-buňky na kombinaci antigenu s molekulami HLA, dojde k aktivaci této buňky a vyplavení cytokinů. Cytokiny jsou mediátory, které nedokáží rozeznat ani reagovat s antigenem, díky němuž byly vyplaveny, ale slouží pro aktivaci B-lymfocytů, makrofágů a dalších T-lymfocytů. Každý lymfocyt potřebuje ke své proliferaci a diferenciaci jak signál zprostředkovaný vazbou antigenu na receptor, tak i tyto stimulační mediátory (Obrázek 11). [4]



Obrázek 11 Regulační funkce TH-lymfocytů[4]

3. Praktická část

3.1 Cíl práce

Cílem této práce je zjistit množství přeživších buněk J-JHAN po různém počtu rázových vln jednoduchých i tandemových, porovnání těchto hodnot a hodnocení výsledků.

Z předchozích experimentů jsou známé účinky rázových vln na erytrocyty. Erytrocyty však mají tenkou buněčnou membránu, což znamená, že mají tendenci popraskat i sami, takže je jasné, že rázové vlna způsobí smrt buněk. V našem případě jsou proto použity buňky lidské T-lymfocytární linie J-JHAN, které mají pevnější buněčnou stěnu podobnou nádorovým buňkám. Z výsledků experimentu tedy můžeme usuzovat, jak by rázová vlna interagovala s nádorovými buňkami.

Předpokládáme, že čím větší počet rázů, tím víc bude usmrcených buněk. Dalším předpokladem pro tuto práci je, jak již plyne z teoretické části o tandemové vlně, že účinnost tandemové rázové vlny bude vyšší než účinnost jednoduché rázové vlny.

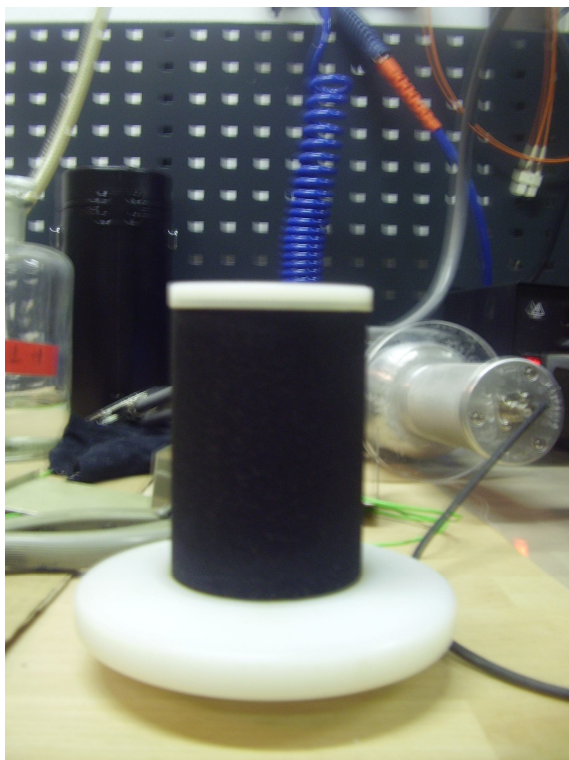
3.2 Metodika práce

3.2.1 Použitý materiál

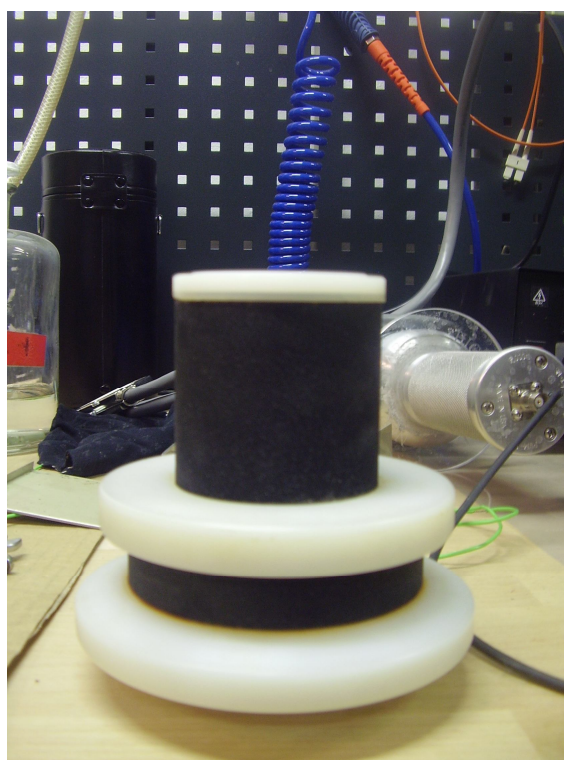
- 1) Buňky J-JHAN
- 2) Pipeta Research vari 100 – 1000 μ l
- 3) Mikrozkušavky Eppendorf 1,5 ml Safe-Lock
- 4) Stojan na mikrozkušavky 1.5ml
- 5) Mikroskop
- 6) Trypanová modř
- 7) Bürkerova počítací komůrka

3.2.2 Exponování

Experiment byl prováděn na ÚFP, kde je umístěn experimentální generátor rázových vln, fungující na principu mnohokanálového impulsního výboje. Podle výběru elektrody je možno generovat jak jednoduchou rázovou vlnu, tak i tandemovou rázovou vlnu. Na obrázku 12 můžeme vidět cylindrickou elektrodu pro generování jednoduché RV, na obrázku 13 pak pro generování tandemové rázové vlny.



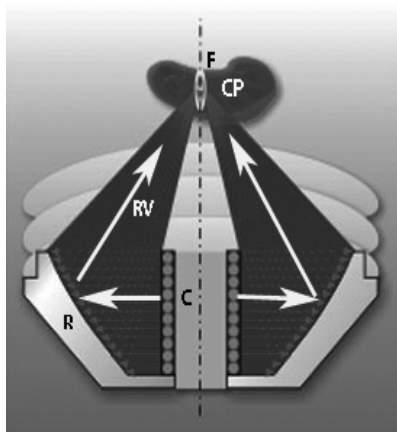
Obrázek 12 Elektroda pro JRV



Obrázek 13 Elektroda pro TRV

Tento přístroj je českým patentem č. 291 158 udělený 30. 10. 2002. Z výzkumů výbojů pro čištění vody vypožadovali, že na kompozitní elektrodě vzniká velké množství výbojových kanálků, a tyto kanálky jsou rovnoměrně rozprostřeny po celé ploše elektrody (anody). Použitá kompozitní elektroda má válcový tvar s povrchem cca 200 cm^2 a je pokryta tenkou vrstvou porézní keramiky kvůli zesílení elektrického pole. Superpozicí výbojových kanálků, vzniklých ve vodě se zvýšenou elektrickou vodivostí v každém póru kompozitní elektrody, se vytváří cylindrická tlaková vlna. Fokusace této vlny probíhá přes kovový parabolický reflektor (katoda). K přeměně na rázovou vlnu dochází až v těsné blízkosti ohniska. Na obrázku 14 je zobrazeno schéma tohoto generátoru. Experimentálně bylo dokázáno, že rozměry ohniska jsou

Ø 2,5 x 35 mm. Hodnoty podtlakové fáze RV v ohnisku dosahují 20 – 25 % velikosti hodnot tlakové fáze, což dá vzniku kavitacím, jelikož bude překročen kavitační práh vody. Díky kolabujícím kavitacím se vytvářejí sekundární krátkovlnné rázové vlny, které jsou schopné narušit tak malé struktury jako jsou buňky.



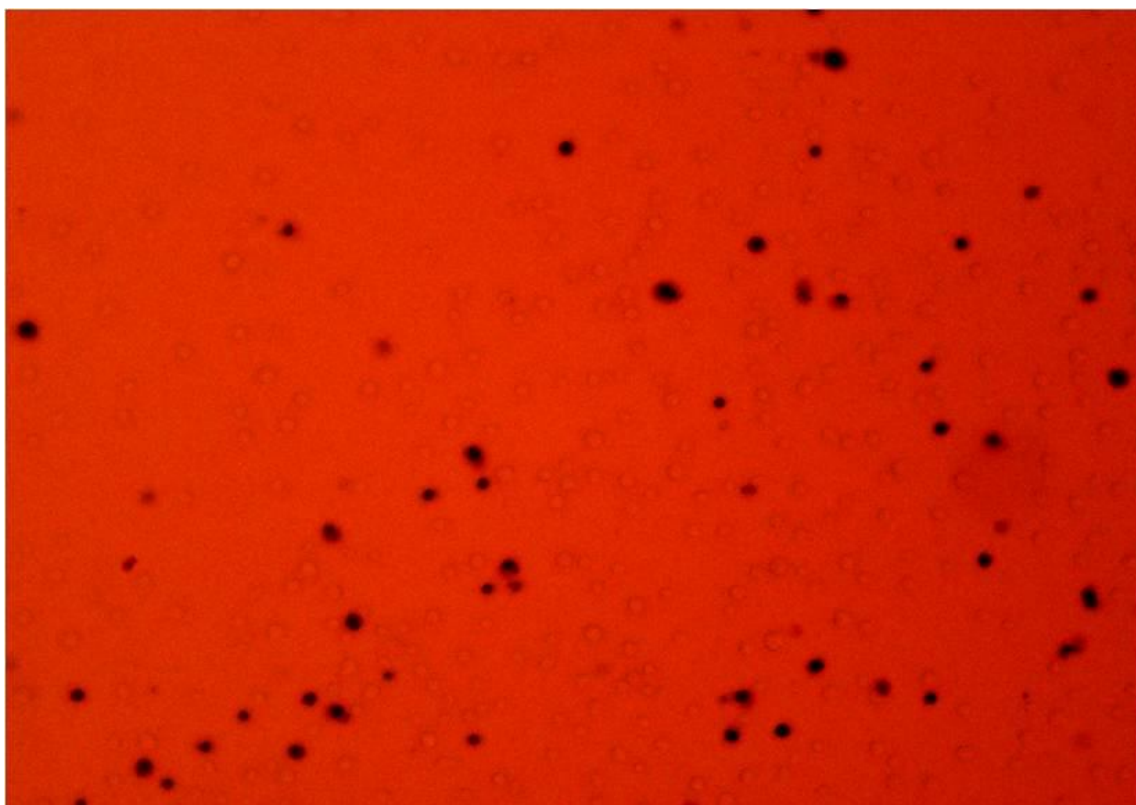
- R – parabolický reflektor
- C – cylindrický zdroj RV
- F – sekundární ohnisko RV
- CP – cílový předmět

Obrázek 14 Schéma mnohokanálového cylindrického zdroje rázových vln

Nejprve byly T-lymfocyty vystaveny účinkům jednoduché rázové vlny, poté účinkům tandemové rázové vlny. Zde je využito kompozitní elektrody rozdělené na dvě části, kde je každá část napájena jiným zdrojem. S určitým časovým zpožděním (do 100 μ s) vznikají dvě po sobě následující rázové vlny, které jsou fokusovány do stejného ohniska. Pozitivní tlaky dosahovaly až 100 MPa při 30 kV.

3.2.3 Stanovení koncentrace živých T-lymfocytů

Důvodem, proč nás zajímá počet živých T-lymfocytů je ten, že koncentrace mrtvých buněk se dá těžko určit. Rázová vlna je nejen schopna buňky usmrtit, ale působí i mechanické narušení buňky tak, že zcela uvolní nitrobuněčný obsah do okolí. Na obrázku 15 vidíme kontrolní vzorek s živými neobarvenými a mrtvými obarvenými buňky, na obrázku 16 jsou pak vidět buňky po 160 rázech, kde je těžko určitelné, zda zbylá drť (úplně destruované buňky) byla původně jedna buňka či čtyři. Určovány byly jak mrtvé, tak i živé buňky, ale výsledky uvažujeme pouze z živých buněk.



Obrázek 16 Kontrolní vzorek (obarvený trypanovou modří) pod světelným mikroskopem



Obrázek 15 Vzorek po 160 rázech (obarvený trypanovou modří) pod světelným mikroskopem

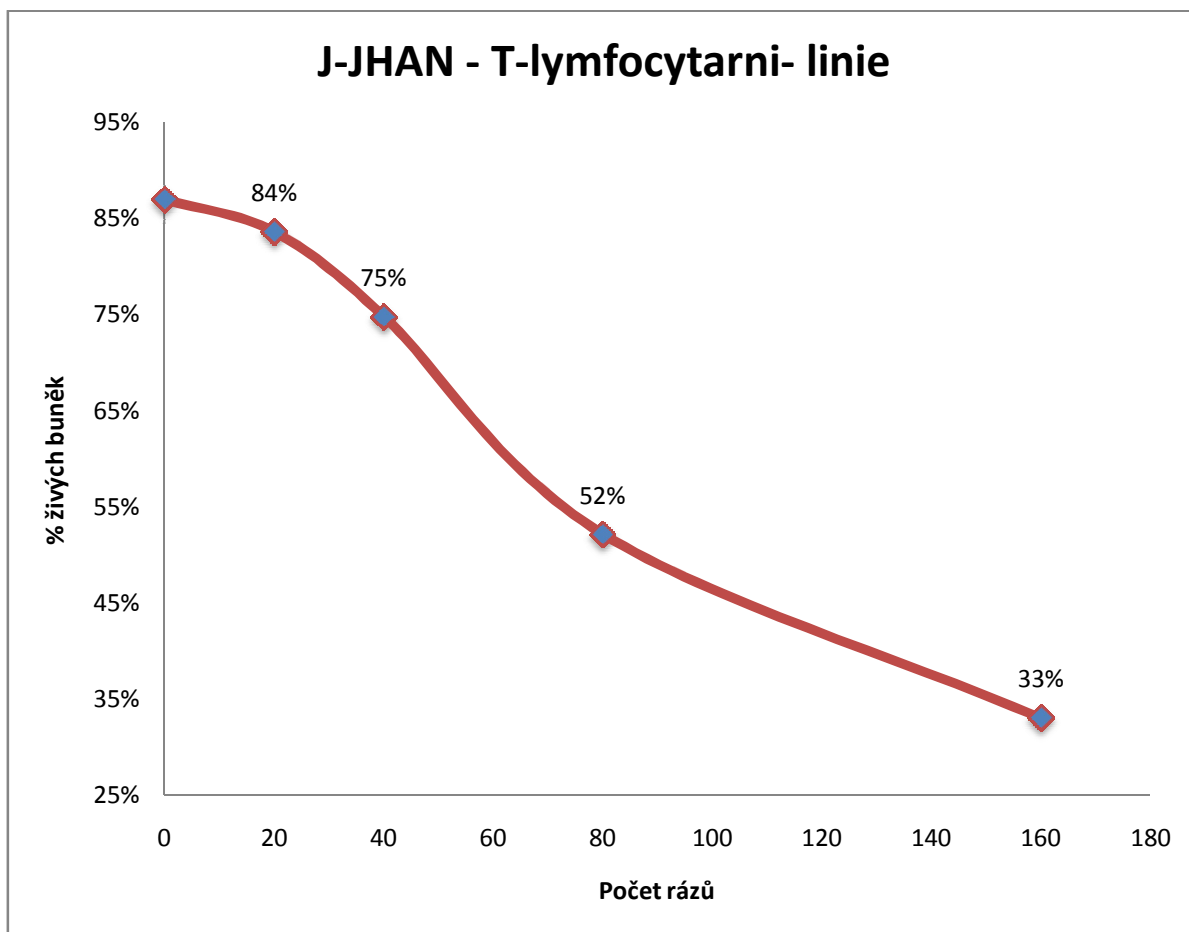
T-lymfocyty jsou obarvovány trypanovou modří. Ta je živými buňkami aktivně transportována ven z buněk, kdežto mrtvé buňky zůstanou obarvené. Životnost je tedy stanovena ručním počítáním pod světelným mikroskopem v Bürkerově komůrce. Počet živých T-lymfocytů byl vždy určen ze dvou různých čtverečků Bürkerovy komůrky, proto můžeme ve výsledných tabulkách vidět dva různé počty živých T-lymfocytů.

3.3 Výsledky

První experiment byl prováděn pouze jednoduchou rázovou vlnou (Single), abychom zjistili, jaké účinky má na buňky J-JHAN. Začínali jsme na 20 rázech a počet rázů se dále zdvojnásoboval až do 160 rázů. Vždy byly vystaveny účinku rázové vlny tři mikrozkuhavky Eppendorf s buňkami J-JHAN na stejný počet rázů, jejich výsledky byly zprůměrovány. Z tabulky 1 a grafu 1 je patrné, že se zvyšujícím se počtem rázů klesá životnost buněk. K signifikantnímu poklesu životnosti dochází po 80 rázech.

Tabulka 1 Koncentrace živých buněk J-JHAN v závislosti na počtu rázů (do 160) při aplikaci JRV

Rázy	ž	ž	m	m	živé součet	mrtvé součet	celkem buněk	% živých	± % živých
20	56	52	13	8	108	21	129	91%	94%
20	61	54	9	13	115	22	137	97%	
20	64	50	13	10	114	23	137	96%	
40	40	38	14	18	78	32	110	66%	84%
40	63	56	16	20	119	36	155	100%	
40	52	50	15	16	102	31	133	86%	
80	37	34	27	26	71	53	124	60%	57%
80	31	30	34	29	61	63	124	51%	
80	34	38	32	40	72	72	144	61%	
160	19	20	34	31	39	65	104	33%	27%
160	16	18	26	29	34	55	89	29%	
160	11	13	38	40	24	78	102	20%	
Kontrola	59	60	8	10	119	18	137	87%	

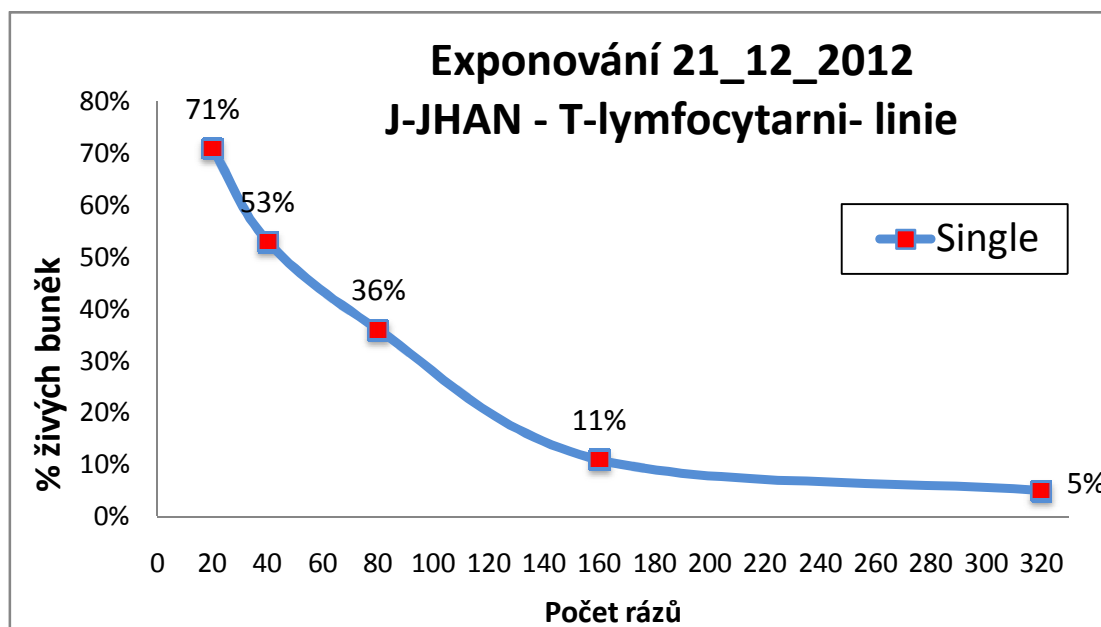


Graf 1 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci JRV

Další dva experimenty probíhaly až do 320 rázů. Stejně jako u předchozího byly vždy tři zkumavky vystaveny stejnému počtu rázů. V jednom pokusu byla znovu použita jednoduchá rázová vlna (single), tyto výsledky jsou obsaženy v tabulce 2 a grafu 2, v dalším pak tandemová rázová vlna (tandem), výsledky jsou zaznamenány v tabulce 3 a grafu 3. Zde také dochází k signifikantnímu poklesu životnosti buněk po aplikaci 80 rázových vln, ale také ještě k dalšímu signifikantnímu poklesu po aplikaci 160 rázových vln.

Tabulka 2 Koncentrace živých buněk J-JHAN v závislosti na počtu rázů (do 320) při aplikaci JRV

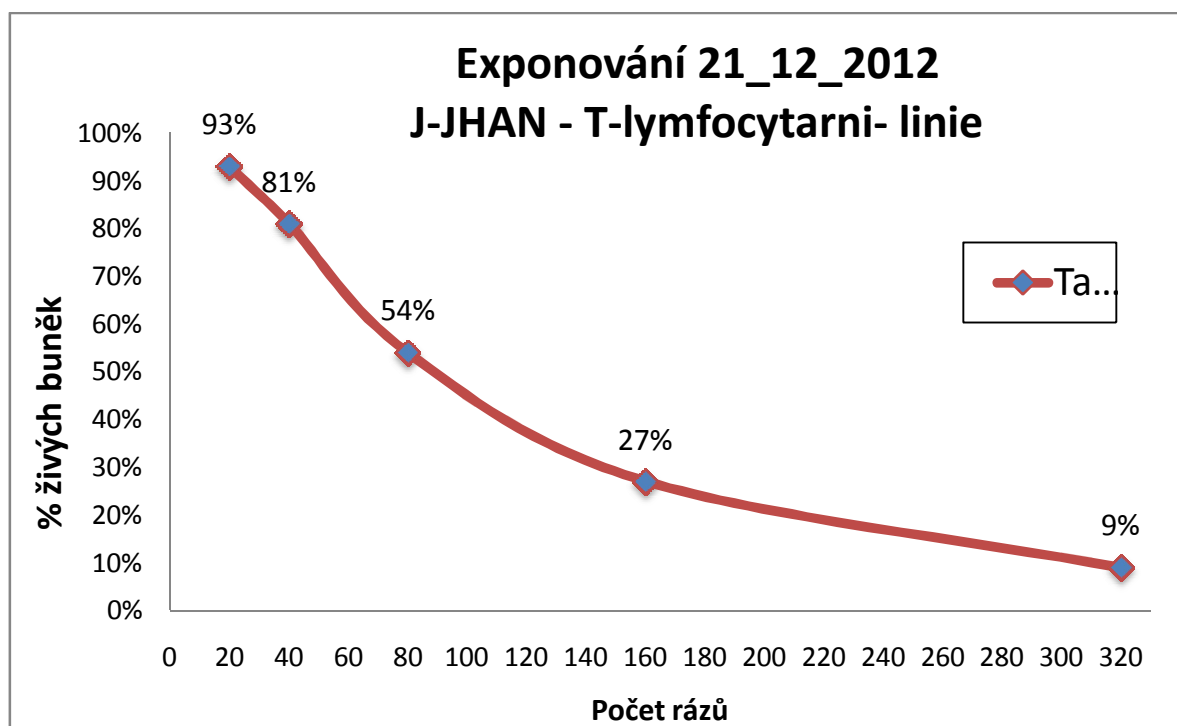
Rázy	ž	ž	m	m	živé součet	mrtvé součet	celkem buněk	% živých	Æ % živých
20	45	39	19	17	84	36	120	68%	71%
20	48	47	15	16	95	31	126	77%	
20	41	44	17	26	85	43	128	69%	
40	31	29	29	33	60	62	122	49%	53%
40	28	36	31	26	64	57	121	52%	
40	38	33	28	27	71	55	126	57%	
80	24	17	42	26	41	68	109	33%	36%
80	21	25	35	26	46	61	107	37%	
80	19	29	36	40	48	76	124	39%	
160	2	9	25	31	11	56	67	9%	11%
160	10	5	42	27	15	69	84	12%	
160	9	5	29	45	14	74	88	11%	
320	4	2	24	22	6	46	52	5%	5%
320	3	3	20	17	6	37	43	5%	
320	2	3	21	21	5	42	47	4%	



Graf 2 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci JRV

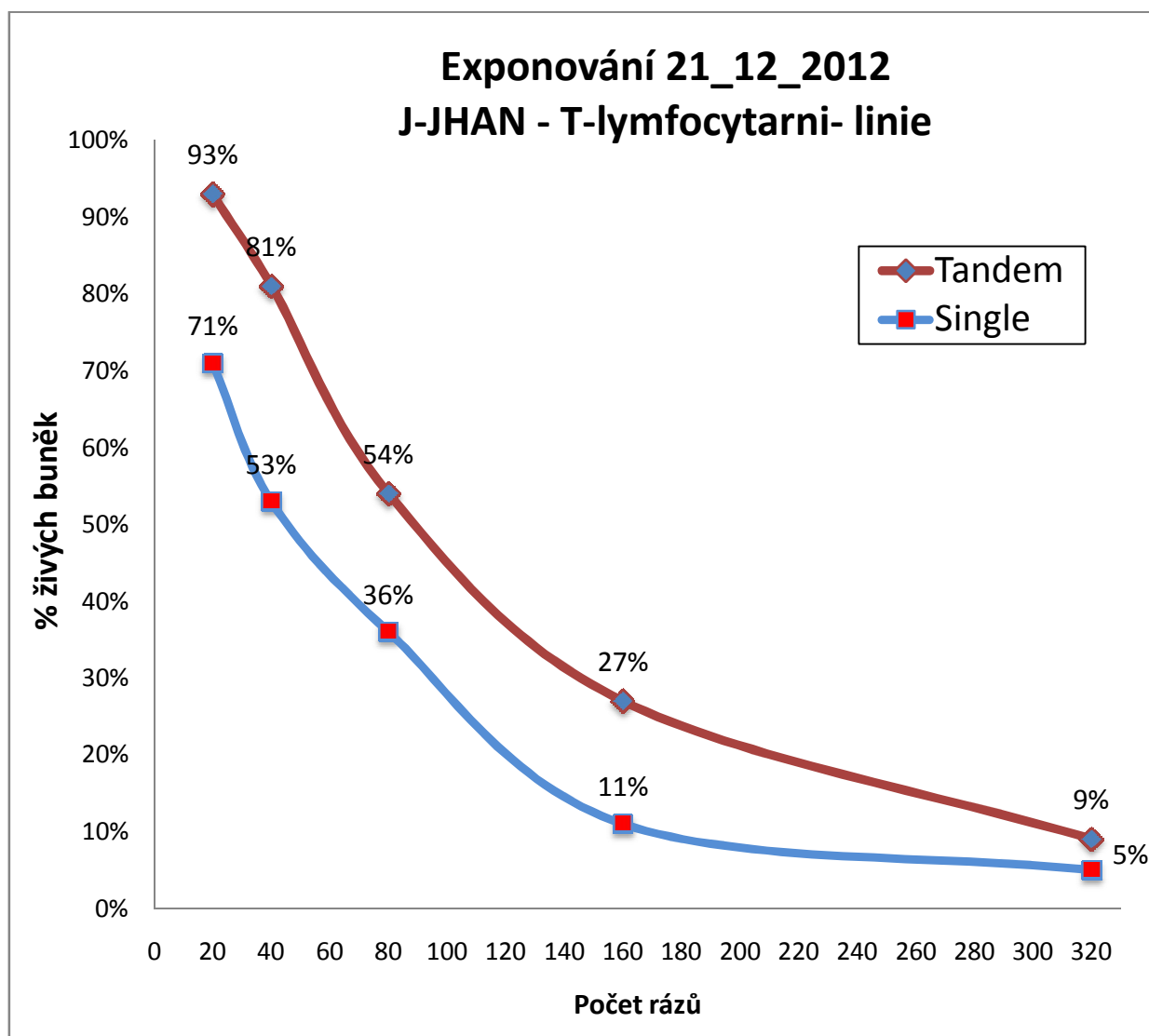
Tabulka 3 Koncentrace živých buněk J-JHAN v závislosti na počtu rázů (do 320) při aplikaci TRV

Rázy	ž	ž	m	m	živé součet	mrtvé součet	celkem buněk	% živých	Æ % živých
20	58	52	13	10	110	23	133	89%	93%
20	61	54	14	13	115	27	142	93%	
20	64	55	13	14	119	27	146	96%	
40	40	38	14	18	78	32	110	63%	81%
40	63	56	16	20	119	36	155	96%	
40	52	50	15	16	102	31	133	83%	
80	37	34	20	26	71	46	117	57%	54%
80	26	30	25	26	56	51	107	45%	
80	34	38	36	40	72	76	148	58%	
160	19	20	34	31	39	65	104	32%	27%
160	16	18	26	29	34	55	89	28%	
160	13	13	38	40	26	78	104	21%	
320	7	6	33	37	13	70	83	11%	9%
320	4	3	32	43	7	75	82	6%	
320	8	4	28	41	12	69	81	10%	



Graf 3 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci TRV

Zajímavé bylo porovnání účinků jednoduché rázové vlny a tandemové. Výsledky experimentu se neshodovaly s výsledky předpokládanými. Předpokládá se, že hodnoty tandemových rázových vln budou převyšovat hodnoty jednoduchých rázových vln. V našich výsledcích je však tomu naopak. V grafu 4 můžeme vidět výsledky obou měření v jednom grafu a porovnat hodnoty.



Graf 4 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci JRV a při aplikaci TRV

4. Diskuze

Výsledky ukazují, jak jsme předpokládali, že se zvyšujícím se počtem rázových vln se bude snižovat životnost T-lymfocytů. Dále jsme dokázali, že rázová vlna nemusí buňku pouze usmrtit, ale působí až destruktivně (rozdrtí buňky tak, že jsou nerozpoznatelné).

Zajímavým výsledkem však bylo porovnání jednoduché rázové vlny s tandemovou. Ačkoliv jsme předpokládali, že tandemová RV bude mít větší účinnost než jednoduchá RV, v našem experimentu tomu bylo naopak. Na tkáních se ukazuje rozsáhlejší destrukce histologicky. Důvodem není jen struktura tkání, ale i to, že plocha vzniku jednoduché rázové vlny je větší a tedy šíře ohniska a tlaky v něm jsou mnohonásobně vyšší než u tandemových rázových vln. Zde je ohnisko malé, efekt nastává pouze v 1-3 mm šíře ohniska.

Celková energie jak JRV, tak TRV, měřená v mJ, je stejná. Tato energie je dána vztahem $E = (A - \rho c) \int p^2(t) dt$, kde A je plocha vlnoplochy, ρ je hustota média, c je rychlost šíření v médiu, p je tlak a t je čas. Celková energie aplikovaná na buňky se rovná energii jedné rázové vlny násobená počtem rázových vln. Jedná se o vzorec, který sice definuje celkovou energii rázové vlny, ale nezahrnuje velikost ohniska (může se šířit do malého ohniska či nefokusovaná do prostoru). Proto si musíme definovat vzorec, který udává určité množství energie na jednotku plochy, což je hustota energie $EFD = (A - E) = (1 - \rho c) \int p^2(t) dt$. EFD dosahuje hodnot okolo 2,26 mJ/mm². Čím menší budou rozměry ohniska, tím více energie bude dopadat na menší plochu, tudíž hustota energie bude větší, a naopak.

Další možností interpretace je, že fyzikální experimenty prokazují zajímavé projevy druhé rázové vlny. Při určitých zpožděních nebo tlacích (myšleno - poměru první a druhé rázové vlny) se druhá rázová vlna jakoby ztrácí – tedy disipace kavitací nastane před nebo za ohniskem. Dokazuje to, že tato jistě efektivní metoda k destrukci nežádoucích buněk ještě vyžaduje řadu testování na modelech, i přesto, že účinek na tkáních byl přesvědčivě prokázán jak na magnetické rezonanci, ale především i na histologii.

Další příčinou tohoto výsledku může být promíchávání roztoku s buňkami v mikrozkuhavce. Při dopadu rázové vlny na buňky, může dojít k promíchání roztoku či nikoliv. Z toho vyplývá, že nevíme, jestli další rázová vlna udeří do těch samých buněk (do stejného místa) jako předešlá, nebo v případě, že se roztok promíchá, má šanci usmrtit jiné buňky. Roztok může také cirkulovat pouze v jednom místě a rázová vlna nebude moci destruovat jiné buňky. Rozdíl v promíchání vzorku může být i mezi jednoduchou a tandemovou RV. Jednoduchá RV využívá většího tlaku a celkovou energii nese pouze jedna vlna, může tedy docházet k promíchání roztoku jiným způsobem (například může roztok více cirkulovat). Tandemová rázová vlna využívá kavitaci k destrukci buněk, stačí jí menší tlaky a celková energie je rozložena do obou po sobě následujících rázových vln.

Jelikož se naše výsledky neshodují s předpokládanými výsledky, nebylo prokázáno, že tandemová rázová vlna má větší účinnost než jednoduchá, měl by tento experiment být předmětem dalšího zkoumání. Zajímavé by také bylo zjišťovat, jakým způsobem jsou buňky usmrcovány. Například metodou PCR by se mohlo hodnotit, jak je po aplikaci rázové vlny poškozeno buněčné jádro, nebo pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorovat, jak je poškozena buněčná membrána.

5.Závěry

- Se zvyšujícím se počtem tlakových vln se snižuje koncentrace živých T-lymfocytů
- I přestože mají T-lymfocyty odolnější membránu než erytrocyty, dochází pomocí rázové vlny k jejich usmrcení → rázová vlna by měla být schopna usmrtit i nádorové buňky
- Rázová vlna nejen usmrcuje buňky, ale působí na ně až destruktivně
- V tomto případě je účinnost tandemové rázové vlny (→ počet usmrcených buněk) nižší než u jednoduché rázové vlny, což nemusí být obecně platné

Seznam literatury

- [1] LOSKE, Achim M. *ShockWavePhysicsforUrologists*. Querétaro (México) : Campus Juriquilla, 2007, ISBN 978-970-32-4377-8.
- [2] BENEŠ, Jiří, Čestmír ŠTUKA. *Optimalizace klinického využití rázových vln*. Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR, Praha, 1993.
- [3] KIM, Samuel C., Robert B. NADLER. *Extrakorporální litotripse rázovou vlnou : perspektivy*. vydáno díky edukačnímu grantu firmy Pfizer, Houston (Texas) : American Urological Association, 2000.
- [4] TROJAN, Ladislav a kol. *Lékařská fyziologie*. 4. vydání, přepracované a doplněné, Praha : GRADA Publishing, 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
- [5] ROZMAN, Jiří a kolektiv. *Elektronické přístroje v lékařství*. 1. vydání, Praha : ACADEMIA, 2006. 408 s. ISBN 80-200-1308-3.
- [6] VOKURKA, M. a kol. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. Praha : Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1561-5.
- [7] BENEŠ, Jiří, Čestmír ŠTUKA, Pavel KLENER, Pavel ŠUNKA, Pavel BUBENÍK, Dana HLOUŠKOVÁ. *Biologické účinky rázových vln a možnosti jejich terapeutického využití*. Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR, Praha, 1995.
- [8] *ESWT New treatment Guide*, Storz Medical AG.
- [9] BENEŠ, Jiří. *Terapeutické využití velmi intenzivního fokusovaného ultrazvuku*. Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR, 1. Interní klinika Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK, Praha, 2000.

[10]HRAZDÍRA, Ivo, Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Brno : Neptun, 2001. ISBN 80-902896-1-4.

[11]DRACH, G. W. *Common Problems in Infections and Stones*. St. Louis : MosbyYearBook, 1991, ISBN 0-8151-2909-2.

[12] ROSINA, J., H. KOLÁŘOVÁ, J. STANEK. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání, Praha : GRADA Publishing, 2006. ISBN 978-80-247-1383-0.

[13]ROSSING, Thomas D. *Handbook of Acoustics*. Stanford (USA) : Springer, 2007. ISBN 978-0-387-30446-5.

[14]. BAITLER, Tomáš, Jana SACHOVÁ, Michael URBAN. *Řešení urolitiázy pomocí litotrypsy extrakorporální rázovou vlnou*[online] 4. 10. 2005 [cit. 10. 12. 2012]. Dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/reseni-urolitiaz-y-pomoci-litotrypsy-extrakorporalni-razovou-vlno-168668>>.

[15]*Nejčastější indikace k léčbě rázovou vlnou*. [online] Společnost Revmacentrum MUDr. Mostera, s.r.o. [cit. 25. 1. 2013]. Dostupné z: <http://www.revmacentrum.cz/indikace_cs.html>.

[16] FÓGEL, Kamil. *Fyzikální základy extrakorporální litotrypsy*. [online] 2. 12. 2009 [cit. 27. 12. 2012]. Dostupné z: <http://www.czechurol.cz/dwnld/1002_73_80.pdf>.

[17]CINATL, J. Jr., J. CINATL, B. WEBER, H. RABENAU, H. O. GÜMBEL, B. KORNUBER, H. W. DOERR. *Replication of human herpesvirus type 6 (strain AJ) in JJHan cells grown in protein-free medium*. [online] 1995 [cit. 12. 2. 2013]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638436>>.

[18]*Princip léčby pohybového aparátu pomocí rázové vlny*. [online] Společnost Revmacentrum MUDr. Mostera, s.r.o. [cit. 4. 3. 2013]. Dostupné z: <http://www.revmacentrum.cz/princip_cs.html>.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 Průběh rázové vlny [18]</i>	14
<i>Obrázek 2 Schéma vzniku rázové vlny [2]</i>	15
<i>Obrázek 3 Princip desintegrace konkrementu [3]</i>	16
<i>Obrázek 4 Srovnání průběhů tlaku ultrazvukové a rázové vlny [5]</i>	17
<i>Obrázek 5 Porovnání frekvenčního spektra ultrazvukové vlny (vlevo) a rázové vlny (vpravo) [1]</i>	18
<i>Obrázek 6 Elektrohydraulický generátor [5]</i>	20
<i>Obrázek 7 Elektrodynamický generátor [2]</i>	21
<i>Obrázek 8 Elektrodynamický generátor s kmitající válcovou plochou [2]</i>	22
<i>Obrázek 9 Piezoelektrický generátor [5]</i>	23
<i>Obrázek 10 Blokové schéma systému LERV [5]</i>	27
<i>Obrázek 11 Regulační funkce TH-lymfocytů[4]</i>	32
<i>Obrázek 12 Elektroda pro JRV</i>	34
<i>Obrázek 13 Elektroda pro TRV</i>	34
<i>Obrázek 14 Schéma mnohokanálového cylindrického zdroje rázových vln</i>	35
<i>Obrázek 15 Vzorek po 160 rázech (obarvený trypanovou modří) pod světelným mikroskopem</i>	36
<i>Obrázek 16 Kontrolní vzorek (obarvený trypanovou modří) pod světelným mikroskopem</i>	36

Seznam tabulek a grafů

<i>Tabulka 1 Koncentrace živých buněk J-JHAN v závislosti na počtu rázů (do 160) při aplikaci JRV.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabulka 2 Koncentrace živých buněk J-JHAN v závislosti na počtu rázů (do 320) při aplikaci JRV.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabulka 3 Koncentrace živých buněk J-JHAN v závislosti na počtu rázů (do 320) při aplikaci TRV.....</i>	<i>40</i>
 <i>Graf 1 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci JRV.....</i>	 <i>38</i>
<i>Graf2 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci JRV.....</i>	<i>39</i>
<i>Graf 3 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci TRV.....</i>	<i>40</i>
<i>Graf 4 Závislost koncentrace živých J-JHAN buněk na počtu rázů při aplikaci JRV a při aplikaci TRV.....</i>	<i>41</i>